Über Synthese und Komplexbildungsvermögen linearer Peptide aus Glycin und L-Histidin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hiro Shivdasani

aus Karachi

1965

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Über Synthese und Komplexbildungsvermögen linearer Peptide aus Glycin und L-Histidin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hiro Shivdasani

aus Karachi

1. Berichtserstatter: Prof. Dr. W. Broser

2. Berichtserstatter: Prof. Dr. G. Manecke

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 26 FEB. 1965

Tag der Promotion: 5. März 1965

INHALTSUEBERSICHT

		Seite
I.	Einleitung und Problemstellung	5
II.	Ausführung	8
	a. Synthesewege	8
	b. Potentiometrische Titrationen	12
	c. Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich	31
	d. Infrarotspektren	34
	e. Diskussion der Ergebnisse	37
III.	Experimenteller Teil	
	a. Präparativer Teil	40
	b. Potentiometrische Titrationsmessungen	50
IV.	Zusammenfassung	56
V.	Literaturübersicht	57

Zeichenerklärung

K_{a1}, K_{a2}	Säuredissoziationskonstanten der quarternierten Pyridinstickstoffe der Imidazolringe
K_{a3}	Säuredissoziationskonstante der quarternierten α-Aminogruppe
K_{c1}, K_{c2}, K_{c3}	Säuredissoziationskonstanten der Cu-Peptidkomplexe
$\bar{n}$	Die durchschnittliche Anzahl der Peptid-Moleküle, die durch jedes Metall-Ion während des Prozesses der Titration gebunden werden.
Cbo-	Carbobenzoxy-

Die Aminosäurebausteine in den Peptiden werden nach dem allgemein üblichen System mit ihren ersten drei Anfangsbuchstaben benannt.

I. Einleitung und Problemstellung

In den letzten Jahren ist auf dem Gebiet der Synthese der Polypeptide mit wachsender Intensität gearbeitet worden. So haben W. Lautsch und Mitarbeiter (1–4) in den letzten Jahren zur Aufklärung der Peptid-Struktur durch eindeutige Synthese verschiedener linearer und cyclischer Peptide beigetragen und deren Eigenschaften untersucht.

Vielfach wurde gefunden, daß in biologischen Systemen Metall-Ionen mit Proteinen als Komplexbildner verknüpft sind. So ist die Aktivität von Enzymen stark abhängig von der Gegenwart geeigneter Metall-Ionen. Häufig werden Metall-Ionen für das verbindende Glied zwischen Enzym und Substrat gehalten.

Als Modellsubstanzen werden Peptide herangezogen, die sich in Aminosäure-Sequenz und -Anzahl voneinander unterscheiden, um so den Seitenketten-Einfluß auf das Komplexbildungsvermögen mit Metall-Ionen zu untersuchen. Die Stabilitätskonstanten-Bestimmung von solchen Komplexen hat die Kenntnisse über Metall-Peptid-Komplexe vertieft. Die Stabilitätskonstanten-Bestimmung mit Hilfe von potentiometrischen Messungen wurde von J. Bjerrum (5) entwickelt und danach von verschiedenen Autoren angewandt, um das Verhältnis zwischen Peptiden und Metall-Ionen zu studieren. So stellte C.B. Monk (6) fest, daß die Peptide, die keine aktiven Seitenketten tragen, wie Glycylglycin, schwächere Komplexe

auszubilden vermögen, als einfache Aminosäuren. H. Dobbie und W.O. Kermack (7) stellten bei potentiometrischen Messungen des Kupfer-Komplexes des Glycylglycins fest, daß bei höherem p_H das Proton des Peptidstickstoffs ionisiert wird, so daß sich folgende Strukturformel (Abb.1) ergeben würde:

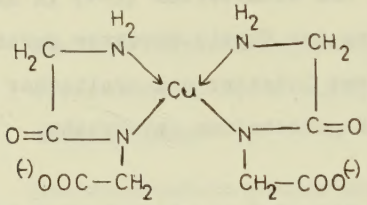


Abb. 1

I.M. Klotz und Mitarbeiter (8) berichteten, daß die endständigen Carboxyl- und Amino-Gruppen für die Komplexbildung der Glycin-Peptide mit Cu^{++} verantwortlich sind. Hierdurch ergab sich ein Polynuklearkomplex nach folgender Abb.2.

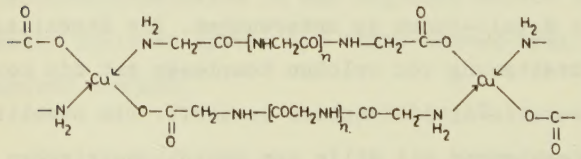


Abb. 2

A.R. Manyak und Mitarbeiter (9) hielten im Falle von Histidin den "Pyridinstickstoff" des Imidazolringes und die

α-Aminogruppen für Koordinationsstellen. J. Engelmann (10) untersuchte die Stabilitätskonstante der Zn-Histidyl-Verbindungen und postulierte im Falle des Zn-Glycyl-L-histidin-Komplexes, daß bei $p_H > 7$ Zn^{++} an beide Imidazolyl-Stickstoffe gebunden ist.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Komplexbildungsverhältnisse an höheren Glycin- und L-Histidin-haltigen Peptiden mit Hilfe der potentiometrischen Titration und Spektralanalyse untersucht werden. Dazu werden verschiedene Tri- und Hexa-Peptide auf eindeutigem Wege synthetisiert.

II. Ausführung

a. Synthesewege

Die Synthese der Peptide, die L-Histidin enthalten, machte solange Schwierigkeiten, bis R.W. Holley und E. Sondheimer (11) gute Ergebnisse erhielten, indem sie die modifizierte Azidmethode und ungeschütztes L-Histidin verwandten. Diese Methode ist in vorliegender Arbeit angewendet worden, da die Ausbeute gut ist und die Produkte sehr rein sind. Außerdem fand praktisch keine Recemisierung statt. In den meisten Fällen kristallisiert das Peptid aus, sobald die beiden Komponenten - das nötige Azid und Aminosäureester bzw. Peptidester - zusammengegeben werden .

Die Umwandlung eines Cbo-Peptidesters in ein Cbo-Peptidhydrazid wird desto schwieriger, je länger die Peptidkette ist. Cbo-gly-OC_2H_5 reagiert mit Hydrazinhydrat schon bei Zimmertemperatur, dagegen erfordert Cbo-gly-L-his-OCH_3 halbstündiges Erwärmen unter Rückfluß, um mit Hydrazinhydrat zu reagieren, während Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 drei Stunden mit Hydrazinhydrat erhitzt werden muß.

Die Umwandlung eines Hydrazides in ein Azid geschieht durch Umsetzung mit $HCl/NaNO_2$ bei 0°C. Bei L-Histidin enthaltenden Peptiden fällt das Azid aus, sobald die Lösung mit 50 %iger K_2CO_3-Lösung versetzt wird. Bei anwachsender Peptidkette, bereits im Falle des Dipeptides Cbo-L-his-

gly-N_3, konnte kein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden, um es aus wässriger Phase zu extrahieren. Deswegen wurde das Azid in solchen Fällen schnell bei 0°C abgesaugt, mit Wasser gewaschen und einer Lösung zugefügt, die den zur Kupplung notwendigen Aminosäureester bzw. Peptidester enthielt.

Die Hydrolyse der Estergruppe konnte im Falle des Tripeptides Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 leicht mit der äquivalenten Menge von 1n-KOH in alkoholischer Lösung durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen kann man die Bildung des Hydantoinderivates (12) vermeiden.

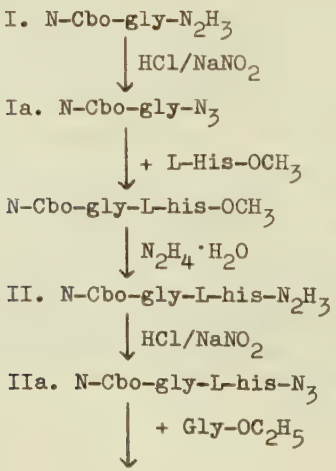
Die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe wurde sowohl durch katalytische Hydrierung als auch durch 1n-HBr/Eisessig erreicht. Die erste Methode ist vorteilhafter, da die Ausbeuten höher und die Produkte sauberer sind.

Von den drei Tripeptiden, Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5, Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3 und Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3, macht die Synthetisierung des letzten Tripeptides außerordentliche Schwierigkeiten. Mischt man die Lösungen von Cbo-gly-L-his-N_3 mit L-His-OCH_3 in Essigester, so wird ein Oel erhalten, das nach langem Stehen in Kühlschrank fest wird. Durch mehrmalige Umkristallisation aus Alkohol/Wasser konnte es gereinigt werden. Diese Erscheinung könnte so erklärt werden, daß zwei Aminosäuren, die Imidazolgruppen tragen, in Nachbarstellung

stehen.

Peptide, die L-Histidin enthalten, sind wegen der Wasserstoffbrücken im Molekül stark lipophob. Aus diesem Grunde bietet ihre Reinigung einige Schwierigkeiten. Hier ist die Azidmethode sehr vorteilhaft, da der gute Reinheitsgrad befriedigend durch Umkristallisation erreicht werden kann. In den meisten Fällen wurden sie aus 80 %igem Alkohol umkristallisiert. Dagegen konnte das Hexapeptid Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-OC_2H_5 auf diese Art nicht umkristallisiert werden. Es wird in 1 n HCl gelöst und durch Einzufügen von 1 n NaOH der isoelektrische Punkt eingestellt, wobei es in Kristallen ausfällt.

Die zur Darstellung der Tripeptide und Hexapeptide erforderlichen Zwischenstufen und Synthesewege ergeben sich aus den folgenden Schema:



III. N-Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5

↓ KOH

IV. N-Cbo-gly-L-his-gly-OH

↓ Pd/H_2

V. Gly-L-his-gly-OH

IIa. N-Cbo-gly-L-his-N_3

↓ + L-His-OCH_3

VI. N-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3

N-Cbo-L-his-gly-N_2H_3

↓ $HCl/NaNO_2$

N-Cbo-L-his-gly-N_3

↓ + L-His-OCH_3

VII. N-Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3

III. N-Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5

$N_2H_4 \cdot H_2O$ ↙ ↘ HBr/Eisessig

VIII. N-Cbo-gly-L-his-gly-N_2H_3 IX. Gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HBr$

$HCl/NaNO_2$ ↓ ↓ Dicyclohexylamin

VIIIa. N-Cbo-gly-L-his-gly-N_3 + IXa. Gly-L-his-gly-OC_2H_5

↓

X. N-Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-OC_2H_5

IIa. N-Cbo-gly-L-his-N_3

↓ + Gly-gly-OC_2H_5

XI. N-Cbo-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5

↓ Pd/H_2

XII. Gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5

IIa. N-Cbo-gly-L-his-N_3 + XII. Gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5

↓

XIII. N-Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5

b. Potentiometrische Titration

Bei den höheren Peptiden sind die Komplexbildungsverhältnisse kompliziert, da die verschiedenen aktiven Gruppen in Konkurrenz treten. Aus diesem Grunde wurden die freien Endgruppen mit Schutzgruppen versehen, um die Komplexbildungsreaktionen nur an beschränkten Gruppen zu ermöglichen. So wurden die Untersuchungen an Peptidestern, deren Aminogruppe carbobenzoxyliert war ,durchgeführt. Vergleichsweise wurden in einem Fall die Verhältnisse an einem ungeschützten Peptid studiert.

Die Assoziationskonstanten der Kupferkomplexe folgender Peptide wurden bestimmt :

1. Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5
2. Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3
3. Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3
4. Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5
5. Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-OC_2H_5
6. Gly-L-his-gly-OH

Die Durchführung der potentiometrischen Titration geschieht im allgemeinen wie folgt:
Die Hydrochloride der Peptide wurden durch Lösen von 0,25 mMol der entsprechenden Peptide in der äquivalenten Menge 0,1 n HCl (bei Peptiden mit 2 Imidazolgruppen wurden pro Mol Peptid 2 Mole HCl zugefügt) dargestellt, wobei die Salzbildung am "Pyridinstickstoff" des Imidazolringes eintrat. Die so erhaltenen Lösungen wurden mit 0,1 m NaCl-Lösung auf 50 ml aufgefüllt, damit sie die Ionenstärke von nahezu 0,1 erreichten. Dann wurden sie einmal in Abwesenheit von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und zum andernmal in Gegenwart von verschiedenen molaren Konzentrationen des $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ mit 0,1 n NaOH titriert. Alle P_H-Bestimmungen wurden mit dem Titriskop E 366 (Firma Metrohm AG, Herisau, Schweiz) bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Die Messung der Assoziationskonstanten durch potentiometrische Titration beruht auf der Bestimmung der aus dem Peptid durch das Metall-Ion freigesetzten Protonen (5). Bevor es möglich ist, die Gleichungen für die Assoziationskonstanten aufzustellen, muss erst entschieden werden, welche Reaktionen sich mutmasslich während der Titration abspielen.

In Abb. 3 sind die potentiometrischen Titrationskurven des Cbo-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot$HCl in Abwesenheit von Cu^{++} (Kurve I) und in Gegenwart von Cu^{++} bei einem molaren Verhältnis von Cu^{++} zu Peptid wie 1:2 (Kurve II) wiedergegeben. Aus der Kurve II läßt sich erkennen, daß vier Aequivalente NaOH pro Cu-Atom zur Steigerung des p_H-Wertes der Lösung von 3,8 bis

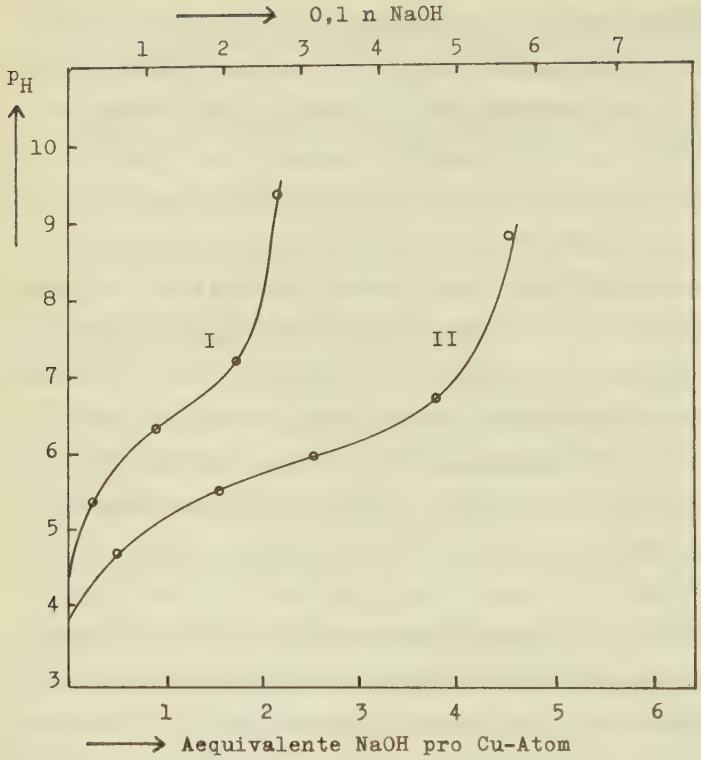


Abb. 3 Titrationskurven der Lösungen von Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5·HCl mit 0,1 n NaOH. Kurve I: Ohne Zugabe von Cu^{++}; Kurve II: In Gegenwart von Cu^{++} bei einem Molverhältnis von Cu^{++} zu Peptid·HCl wie 1:2

6,9 benötigt werden. Offensichtlich ist damit auch der Endpunkt der Titration erreicht, da die Kurve danach steil ansteigt. Somit werden während der Titration vier Protonen freigesetzt, bzw. werden zwei Protonen von jedem Peptidmolekül bei der Komplexbildung abgegeben. Daraus läßt sich schließen, daß jedes Peptidmolekül über zwei Gruppen mit einem Cu^{++} verbunden wird. Da der Pyridinstickstoff des Imidazolringes die am stärksten basische Gruppe des Peptidmoleküls darstellt, ist die Beteiligung dieser Gruppe bei der Komplexbildung zweifellos. Hierdurch ist der Verbrauch eines Aequivalents NaOH pro Cu-Atom im p_H-Bereich zwischen 3,8 und 5,3 mit der Verdrängung von einem Proton aus dem quarternierten Pyridinstickstoff des Imidazolringes gekoppelt, wo bei sich der PCu^{++}-Komplex (P = Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5) bildet. Der Verbrauch des zweiten Aequivalents NaOH pro Cu-Atom im p_H-Bereich von 5,3 bis 5,8 ist bedingt durch das Freiwerden eines Proton aus dem PCu^{++}-Komplex. Hierbei kann dieses Proton aus der Iminogruppe des Imidazolringes oder aus der Peptidbindung (-CO-NH-) abgelöst werden. Eine dritte Möglichkeit wäre die Aufnahme von OH^- durch Cu^{++}. Jedoch ist diese Annahme bei derart niedrigem p_H-Wert nicht wahrscheinlich.

Da die Ionisationskonstante der Iminogruppe des Imidazolringes bei etwa 10^{-12} liegt, ist es im neutralen p_H-Bereich im allgemeinen für diese Gruppe nicht möglich an der Komplexbildung teilzunehmen. So ist von den Autoren (13,14,15), die den Cu-Histidin-Komplex untersucht haben, die Beteiligung

der Iminogruppe des Imidazolringes an der Komplexbildung verworfen worden. Nach J. Engelmann (10) kann der p_K-Wert der Iminogruppe des Imidazolringes durch geeignete Substitution der α-Aminogruppe oder Carboxylgruppe soweit gesenkt werden, daß diese Gruppe schon bei neutralem p_H-Bereich an der Komplexbildung teilnimmt. Aber aus sterischen Gründen ist die Ausbildung eines viergliedrigen Ringes, der die beiden Stickstoffatome des Imidazolringes und das Metall-Ion enthält, nicht wahrscheinlich.

Nach H. Dobbie und W. Kermack (7) nimmt die Peptidbindung beim Cu-Glycylglycin-Komplex an der Komplexbildung teil.

Die Beteiligung der Peptidbindung an der Komplexbildung wird auch durch das IR-Spektrum des Cu-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3-Komplexes bestätigt, da dieses ebenfalls auf eine Wechselwirkung zwischen Metall-Ion und Peptidbindung hinweist (s.Seite 34). So wird auch hier behauptet, daß das Proton im p_H-Bereich 5,3 - 5,8 aus einer Peptidbindung abdissoziiert, wobei sich PCu^+-Komplex bildet.

Nach Absättigung der Liganden eines Peptidmoleküls wird nun das dritte Aequivalent NaOH pro Cu-Atom im p_H-Bereich zwischen 5,8 und 6,25 verbraucht, wobei von einem zweiten Peptidmolekül das Proton vom quarternierten Pyridinstickstoff des Imidazolringes abgelöst wird und sich der P_2Cu^+-Komplex bildet. Der Puffereffekt im p_H-Bereich zwischen 6,25 und 6,9 bei der Zugabe des vierten Aequivalents NaOH

pro Cu-Atom entsteht durch das Abdissoziieren des Protons einer Peptidbindung des zweiten Peptidmoleküls, wobei sich der P_2Cu-Komplex ausbildet. In Abbildung 4 ist die vorgeschlagene Struktur-Formel für diesen Komplex wiedergegeben.

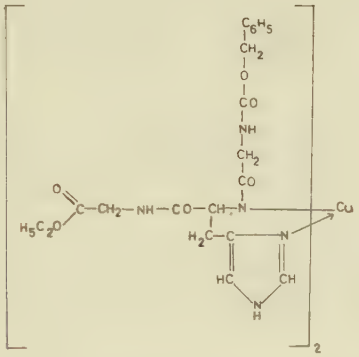


Abb. 4

Bei der Titration der Lösung von $CuCl_2.2H_2O$ und Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5.HCl im molaren Verhältnis von 1:4 stellte sich heraus, daß ebenfalls der P_2Cu-Komplex entsteht. Bei dieser Lösung werden, wie die Titrationskurve (Abb. 5) zeigt, sechs Aequivalente NaOH pro Cu-Atom bis zum Titrationsendpunkt verbraucht. Dabei werden vier Aequivalente NaOH für die Ausbildung der Komplexe PCu^{++}, PCu^{+}, P_2Cu^{+} und P_2Cu gebraucht. Die restlichen zwei Aequivalente NaOH pro Cu-Atom lösen zwei Protonen von zwei quarternierten Pyridinstickstoffen der Imidazolringe der beiden überschüssigen Peptidmoleküle ab.

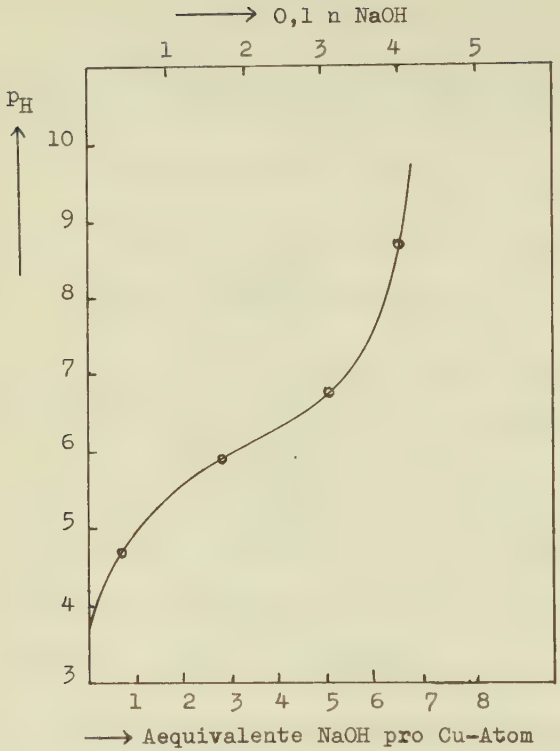


Abb. 5 Titrationskurve der Lösung von Cu^{++} und Cbo-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot HCl$ bei einem Molverhältnis von 1:4, mit 0,1 n NaOH

Die Komplexbildungsreaktion können durch folgendes Schema formuliert werden :

HP^+ = Cbo-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot H^+$

P = Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5

$$HP^{+} \rightleftharpoons P + H^{+} \quad ; \quad K_{a1} = \frac{[P] \cdot [H^{+}]}{[HP^{+}]} \quad ; \quad -\log K_{a1} = pK_{a1}$$

$$P + Cu^{++} \rightleftharpoons PCu^{++} \quad ; \quad K_{1} = \frac{[PCu^{++}]}{[P] \cdot [Cu^{++}]}$$

$$PCu^{++} \rightleftharpoons PCu^{+} + H^{+}; \quad K_{c1} = \frac{[PCu^{+}] \cdot [H^{+}]}{[PCu^{++}]}; \quad -\log K_{c1} = pK_{c1}$$

$$PCu^{+} + P \rightleftharpoons P_2Cu^{+} \quad ; \quad K_{2} = \frac{[P_2Cu^{+}]}{[PCu^{+}] \cdot [P]}$$

$$P_2Cu^{+} \rightleftharpoons P_2Cu + H^{+}; \quad K_{c2} = \frac{[P_2Cu] \cdot [H^{+}]}{[P_2Cu^{+}]}; \quad -\log K_{c2} = pK_{c2}$$

Die potentiometrischen Titrationskurven der Lösungen der Peptide, die zwei Imidazolgruppen enthalten, zeigen den gleichen charakteristischen Kurvenverlauf. Ein Beispiel für derartige Kurven sind die Titrationskurven des Cbo--L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$, die in Abbildung 6 gezeigt sind. Kurve I ist in Abwesenheit von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und Kurve II in Gegenwart von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ bei einem molaren Verhältnis von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ zu Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ wie 1:1 aufgetragen. Aus Kurve II kann man erkennen, daß vier Aequivalente NaOH pro Cu-Atom während der Komplexbildung gebraucht werden. Der Puffereffekt zwischen p_H 3,6 und 5,48 ist bedingt durch die Abtrennung von 2 Protonen der quarternierten Pyridinstickstoffe der Imidazolringe,

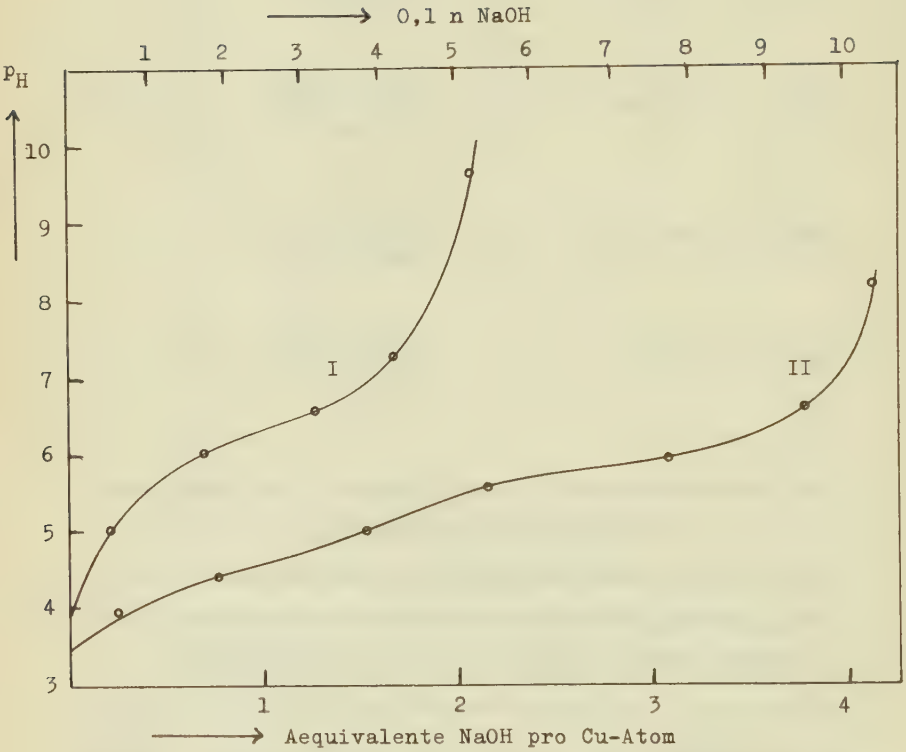


Abb. 6 Titrationskurven der Lösungen von Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ mit 0,1 n NaOH. Kurve I: Ohne Zugabe von Cu^{++}; Kurve II: In Gegenwart von Cu^{++} bei einem Molverhältnis von Cu^{++} zu Peptid·2HCl wie 1:1

die zur Ausbildung des $P'Cu^{++}$-Komplexes (P' = Cbo-L-his-gly--L-his-OCH_3) führt. Im p_H-Bereich 5,48 - 7,00 ionisieren sich zwei Wasserstoffatome aus dem $P'Cu^{++}$-Komplex, wodurch P'Cu-Komplex entsteht. Die Strukturformel des entstandenen Komplexes ist in Abbildung 7 dargestellt.

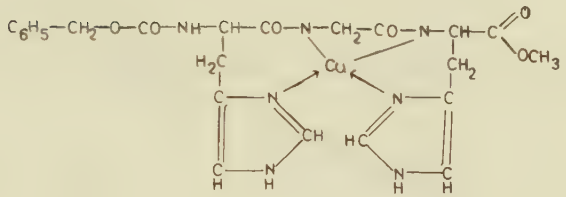


Abb. 7

Weiterhin werden bei der Titration der Lösung von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ im molaren Verhältnis von 1:2 (Abb. 8) insgesamt sechs Aequivalente NaOH pro Cu-Atom verbraucht, davon sind die vier Aequivalente NaOH zur Entstehung der $P'Cu^{++}$- und P'Cu-Komplexe benötigt worden und die restlichen beiden Aequivalente NaOH lösen zwei Protonen aus zwei quarternierten Pyridinstickstoffen der Imidazolringe des überschüssigen Peptidhydrochlorids ab.

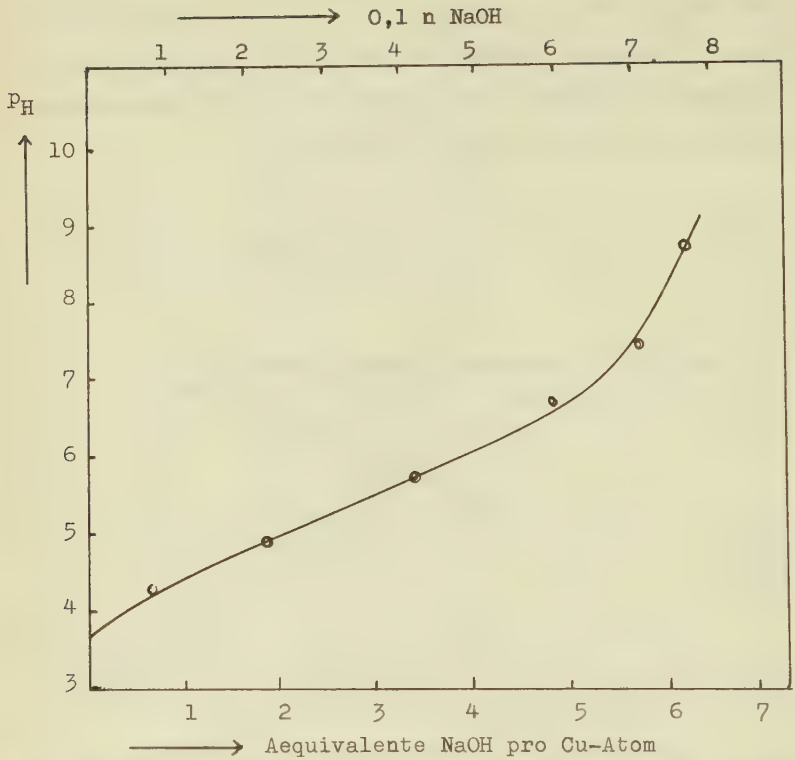


Abb. 8 Titrationskurve der Lösung von Cu^{++} und Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ bei einem Molverhältnis von 1:2, mit 0,1 n NaOH

Die stufenweise Komplexbildung erfolgt nach dem folgenden Schema :

$H_2P'^{++}$ = Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2H^{++}$

P' = Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3

$$H_2P'^{++} \rightleftharpoons HP'^{+} + H^{+} \; ; \; K_{a1} = \frac{[HP'^{+}] \cdot [H^{+}]}{[H_2P'^{++}]} \; ; \; -\log K_{a1} = pK_{a1}$$

$$HP'^{+} \rightleftharpoons P' + H^{+} \; ; \; K_{a2} = \frac{[P'] \cdot [H^{+}]}{[HP'^{+}]} \; ; \; -\log K_{a2} = pK_{a2}$$

$$P' + Cu^{++} \rightleftharpoons P'Cu^{++} \; ; \; K_1 = \frac{[P'Cu^{++}]}{[P'] \cdot [Cu^{++}]}$$

$$P'Cu^{++} \rightleftharpoons P'Cu^{+} + H^{+}; \; K_{c1} = \frac{[P'Cu^{+}] \cdot [H^{+}]}{[P'Cu^{++}]}; \; -\log K_{c1} = pK_{c1}$$

$$P'Cu^{+} \rightleftharpoons P'Cu + H^{+} \; ; \; K_{c2} = \frac{[P'Cu] \cdot [H^{+}]}{[P'Cu^{+}]}; \; -\log K_{c2} = pK_{c2}$$

Tatsächlich wird bei der Titration der Lösung von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und Cbo-gly-L-his-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ im molaren Verhältnis von 1:1 nach Zugabe von vier Aequivalenten NaOH ein kristalliner Niederschlag (Fp. 183°-184°C. (Zer.)) erhalten, welcher bei weiterer Zugabe von NaOH in Lösung geht. Die Analyse von diesem Niederschlag zeigt Cu: 10,8%; C: 48,50%; H: 4,91% (Berechnet: Cu: 11,31%; C: 49,31%; H: 4,81%). Dieses Ergebnis bestätigt, daß der Cu-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3-Komplex im Molverhältnis 1:1 gebildet wird.

In Abbildung 9 werden die Titrationskurven des Gly-L-his-gly-OH·HCl in Abwesenheit und in Gegenwart von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ bei einem Molverhältnis von 1:1 gezeigt. Kurve II zeigt, daß bei

der Zugabe von zwei Aequivalenten NaOH pro Cu-Atom der p_H-Wert der Lösung von 3,0 auf 4,15 steigt. Die in diesem p_H-Bereich abgelösten beiden Protonen stammen wahrscheinlich aus der quarternierten α-Aminogruppe und dem quarternierten Pyridinstickstoff des Imidazolringes, wobei der P"Cu^{++}-Komplex

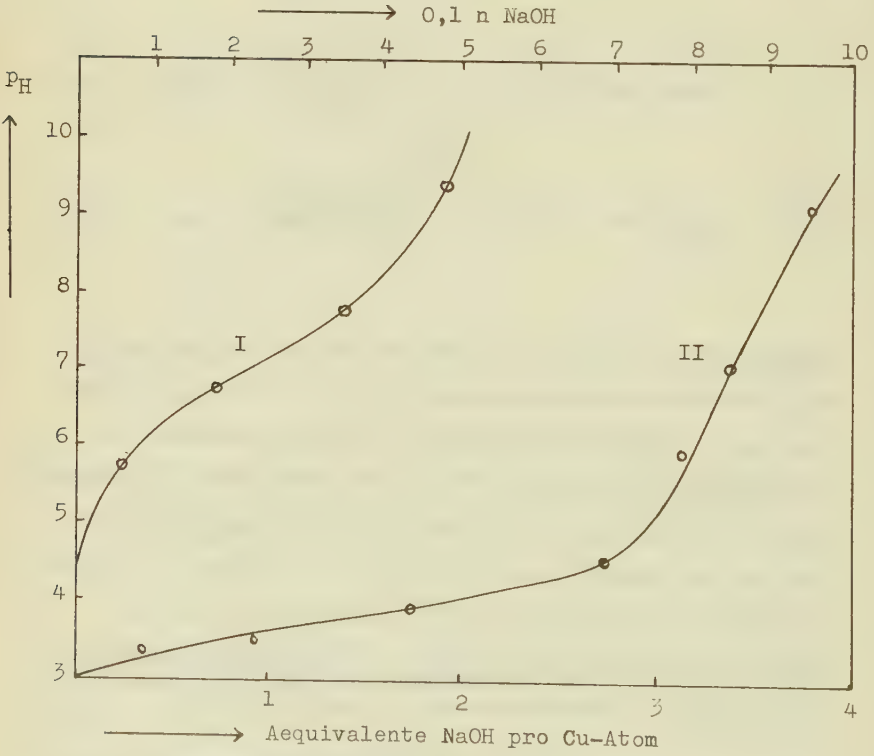


Abb. 9 Titrationskurven der Lösungen von Gly-L-his-gly-OH·HCl mit 0,1 n NaOH. Kurve I: Ohne Zugabe von Cu^{++}; Kurve II: In Gegenwart von Cu^{++} bei einem Molverhältnis von Cu^{++} zu Peptid·HCl wie 1:1

(P" = Gly-L-his-gly-$O^{(-)}$) entsteht. Der Verbrauch des dritten Aequivalents NaOH pro Cu-Atom im p_H-Bereich von 4,15 bis 5,4 wird wahrscheinlich durch das Abdissoziieren des Protons einer Peptidbindung verursacht, wobei der P"Cu^+-Komplex entsteht. Bei der Zugabe des vierten Aequivalentes NaOH steigt der p_H-Wert der Lösung von 5,4 bis 10,3. Dieser p_H-Sprung ist in den vorher beschriebenen Kurven nicht aufgetreten, deshalb wird die Beteiligung der zweiten Peptidbindung an der Komplexbildung nicht angenommen. Wahrscheinlich verliert im diesem p_H-Bereich das an das Cu^{++} gebundene H_2O-Gruppe ein Proton, wodurch die vierte Koordinationsstelle des Cu^{++} durch OH^- besetzt wird. In Abbildung 10 ist die vorgeschlagene Strukturformel des Cu-gly-L-his--gly-OH-Komplexes wiedergegeben

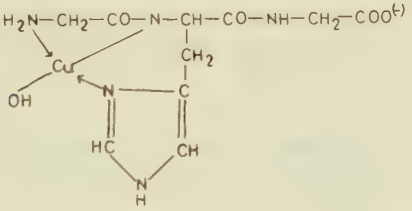


Abb. 10

Abb. 11 zeigt die Titrationskurve der Lösung von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und Gly-L-his-gly-OH·HCl im Molverhältnis von 1:2. Aus dieser Kurve ist ersichtlich, daß sechs Aequivalente NaOH pro Cu-Atom bis zum Endpunkt der Titration benötigt werden.

Bei der Zugabe der ersten drei Aequivalente NaOH bildet sich der P"Cu^{++}- und P"Cu^{+}-Komplex und die restlichen drei Aequivalente NaOH spalten ein Proton aus dem an das Cu^{++} gebundene H_2O und zwei Protonen aus den quarter-

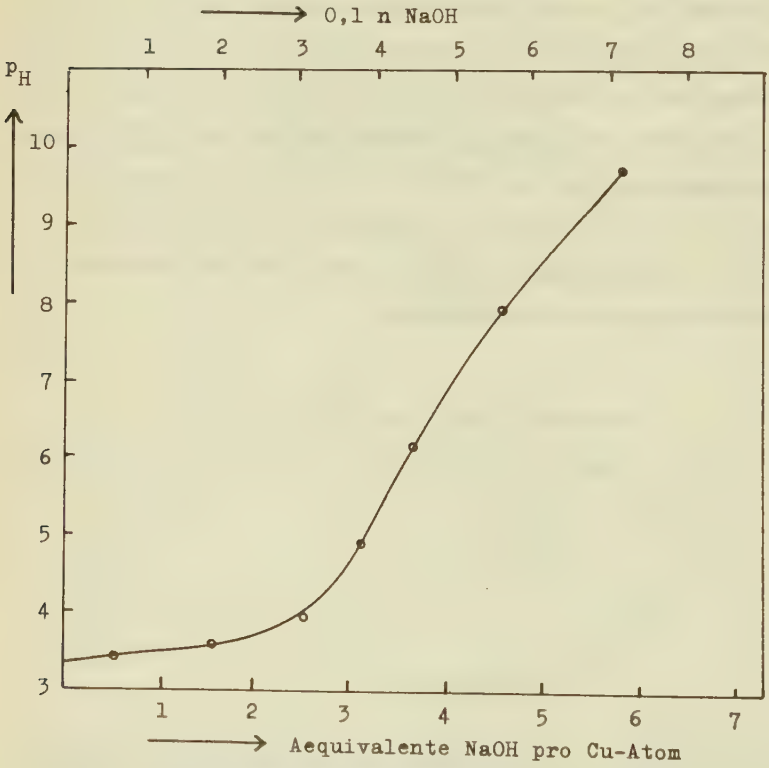


Abb. 11 Titrationskurve der Lösung von Cu^{++} und Gly-L-his-gly-OH·HCl bei einem Molverhältnis von 1:2, mit 0,1 n NaOH

nierten Stickstoffatomen der überschüssigen Peptidmoleküle ab.

Die stufenweise Komplexbildung erfolgt nach dem folgenden Schema:

$H_2P''^{+}$ = Gly-L-his-gly-OH•H^+ ; HP'' = Gly-L-his-gly-OH

P'' = Gly-L-his-gly-$O^{(-)}$

$$H_2P''^{+} \rightleftharpoons HP'' + H^+; \quad K_{a1} = \frac{[HP''] \cdot [H^+]}{[H_2P''^{+}]}; \quad -\log K_{a1} = pK_{a1}$$

$$HP'' \rightleftharpoons P'' + H^+ ; \quad K_{a3} = \frac{[P''] \cdot [H^+]}{[HP'']} ; \quad -\log K_{a3} = pK_{a3}$$

$$P'' + Cu^{++} \rightleftharpoons P''Cu^{++} ; \quad K_1 = \frac{[P''Cu^{++}]}{[P''] \cdot [Cu^{++}]}$$

$$P''Cu^{++} \rightleftharpoons P''Cu^{+} + H^+; \quad K_{c1} = \frac{[P''Cu^{+}] \cdot [H^+]}{[P''Cu^{++}]}; \quad -\log K_{c1} = pK_{c1}$$

$$P''Cu^{+} + H_2O \rightleftharpoons P''CuOH + H^+; \quad K_{c3} = \frac{[P''CuOH] \cdot [H^+]}{[P''Cu^{+}]}; \quad -\log K_{c3} = pK_{c3}$$

Die Säuredissoziationskonstanten pK_{a1}, pK_{a2} und pK_{a3} der verschiedenen Peptidhydrochloride und pK_{c1}, pK_{c2} und pK_{c3} der verschiedenen Cu-Peptid-Komplexe wurden direkt aus den entsprechenden Titrationskurven abgelesen. Die Assoziationskonstanten log K_1 der verschiedenen Komplexe wurden mit den von A. Albert (15) abgeleiteten Gleichungen berechnet.

So wurde Gleichung (i) oder (ii) zur Berechnung von L angewendet, je nach dem ob ein oder zwei Protonen aus den quarternierten Stickstoffatomen des Peptidmoleküls während der Komplexbildung freigesetzt wurden :

$$[L] = \frac{[L_o] - [NaOH] - [H^+]}{\beta} \qquad \text{(i)}$$

$$[L] = \frac{2[L_o] - [NaOH] - [H^+]}{\beta} \qquad \text{(ii)}$$

Hierbei bedeutet $[L_o]$ die Gesamtkonzentration des Peptids (gebunden und frei) und $[L]$ die Konzentration des komplexbildenden Peptids (frei). Der Wert von ß wird bei den verschiedenen Komplexbildnern durch die nachfolgenden Beziehungen wiedergegeben:

$$\beta = \frac{[H^+]}{K_{a1}}$$ für Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 als Komplexbildner

$$\beta = \frac{2[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}}$$ für Peptide mit zwei Imidazolgruppen als Komplexbildner

$$\beta = \frac{2[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}}$$ für Gly-L-his-gly-$O^{(-)}$ als Komplexbildner

Sind die Werte von $[L]$ mit der Gleichung (i) oder (ii) bestimmt, so kann man Assoziationskonstanten ($\log K_1$) mit der folgenden Beziehung (iii) berechnen:

$$\log K_1 = \log \frac{[L_o] - \alpha[L]}{[L]\left([M_o] - [L_o]\right) + \alpha[L]^2} \qquad \text{(iii)}$$

wobei $[M_o]$ gleich der Gesamtkonzentration des Metallions ist und für α folgende Beziehungen gelten :

$$\alpha = \frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1$$

für Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 als Komplexbildner

$$\alpha = \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1$$

für Peptide mit zwei Imidazolgruppen als Komplexbildner

$$\alpha = \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}} + 1$$

für Gly-L-his-gly-$O^{(-)}$ als Komplexbildner

In Tabelle 1 sind die Säuredissoziationskonstanten und die erste Assoziationskonstante wiedergegeben. Die Berechnung der zweiten Assoziationskonstante, die nur im Falle des Cu-Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5-Komplexes auftritt, wurde deshalb nicht durchgeführt, da eine Ionisation an der Peptidbindung stattfindet, bevor das zweite Peptidmolekül mit dem 1:1-Komplex reagiert. Hierdurch erfolgt eine Komplizierung des Reaktionsverlaufes und die oben angegebenen Albert'schen Gleichungen sind für derartige Gleichgewichtssysteme nicht mehr gültig. Aus gleichem Grund wurden "Overall-Stabilitätskonstanten" nicht angegeben. In solchen Fällen ist die Ermittlung der entsprechenden Assoziationskonstanten und Säuredissoziationskonstanten ein befriedigender und gangbarer Weg, wobei die erste Assoziationskonstante als Maß für die Komplexbildung dienen kann (16). Auch für biologische Fragestellungen ist die erste Assoziationskonstante ausschlaggebend und nicht die "Overall-Stabilitätskonstante", da in hochmolekularen Verbindungen wie

Tabelle 1 Säuredissoziationskonstanten und Assoziationskonstanten von Cu-Peptid-Komplexen

Ligand	Säuredissoziationskonstanten der Peptidhydrochloride			Säuredissoziationskonstanten der Cu-Peptid-Komplexe			Assoziationskonstanten der Cu-Peptid-Komplexe
	pK_{a_1}	pK_{a_2}	pK_{a_3}	pK_{c_1}	pK_{c_2}	pK_{c_3}	$\log K_1$
1. Cbo-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot HCl$	6,45	—	—	5,60	6,55	—	3,88
2. Cbo-gly-L-his-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$	5,85	6,95	—	5,70	6,20	—	6,32
3. Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$	5,85	6,95	—	5,75	6,22	—	6,15
4. Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HCl$	5,90	6,85	—	6,15	7,07	—	5,83
5. Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HCl$	5,90	6,87	—	5,87	6,34	—	6,05
6. Gly-L-his-gly-OH·HCl	6,40	—	8,05	4,50	—	7,91	9,91

Proteinen die Beweglichkeit der komplexbildenden Gruppen stark eingeschränkt ist, so daß im allgemeinen nur die erste Stufe des Komplexes gebildet werden kann (17)

c. Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich

Die aus den Absorptionsspektren erhaltenen Ergebnisse der Lösungen von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, Peptidhydrochlorid und NaOH in verschiedenen Molverhältnissen sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die molaren Extinktionen sind auf das in den Lösungen anwesende Gesamt-Cu^{++} bezogen.

(1) Abhängigkeit der Absorptionsmaxima der in Tabelle 2 von 1 - 5 aufgeführten Peptidhydrochloride von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und NaOH-Zusatz.

A. Wenn man zu den Lösungen von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und dem entsprechenden Peptidhydrochlorid bei einem molaren Verhältnis von 1:1 vier Aequivalente NaOH pro Cu-Atom zufügt, ergeben sich die Absorptionsmaxima zwischen 560 - 570 mμ.

B. Ist das Verhältnis von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und Peptidhydrochlorid 1:2 und werden vier Aequivalente NaOH pro Cu-Atom zugegeben, so liegen die Absorptionsmaxima der verschiedenen Lösungen zwischen 590 und 600 mμ. Bei Zugabe weiterer NaOH zu diesen Lösungen, d.h. wenn insgesamt sechs Aequivalente NaOH zugefügt werden,

Tabelle 2 Abhängigkeit der Absorptionsmaxima der Cu-Peptid-Komplexe von NaOH Zusatz

Ligand	Cu^{++}/ Ligand 1:1		Cu^{++}/ Ligand 1:2			
	bei Zugabe der 4 Äquivalente NaOH/Cu-Atom		bei Zugabe der 4 Äquivalente NaOH/Cu-Atom		bei Zugabe der 6 Äquivalente NaOH/Cu-Atom	
	$\lambda_{Max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{Max.}$	$\lambda_{Max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{Max.}$	$\lambda_{Max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{Max.}$
1. Cbo-gly-L-his-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$	561	140	590	82	562	129
2. Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$	561	132	591	80	560	124
3. Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HCl$	564	110	590	75	563	115
4. Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HCl$	565	120	600	78	565	124
5. Gly-L-his-gly-OH· HCl	560	95	590	65	561	75
	Cu^{++}/ Ligand 1:2		Cu^{++}/ Ligand 1:4			
	bei Zugabe der 4 Äquivalente NaOH/Cu-Atom		bei Zugabe der 4 Äquivalente NaOH/Cu-Atom		bei Zugabe der 6 Äquivalente NaOH/Cu-Atom	
	$\lambda_{Max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{Max.}$	$\lambda_{Max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{Max.}$	$\lambda_{Max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{Max.}$
6. Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 .HCl	574	110	610	67	575	85

verschieben sich die Absorptionsmaxima zu niedrigeren Wellenlängen und befinden sich dann im Bereich von 560 - 570 mμ. Es ist bemerkenswert, daß dieser Absorptionsbereich mit dem der unter A aufgeführten Bedingungen übereinstimmt und somit bedeutet, daß gleichartige Komplexe gebildet werden. Dieser Beweis bestätigt die Ergebnisse, die aus der potentiometrischen Titration erhalten wurden.

(ii) Abhängigkeit der Absorptionsmaxima des Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5·HCl von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und NaOH-Zusatz-

C. Das Absorptionsmaximum der Lösung von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5·HCl im Verhaltnis 1:2, zu der vier Aequivalente NaOH pro Cu-Atom zugegeben werden, liegt bei 574 mμ.

D. Die Lösung von $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ und Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5·HCl im Molverhältnis 1:4, zu der vier Aequivalente NaOH zugegeben werden, zeigt das Absorptionsmaximum bei 610 mμ. Werden aber zwei weitere Aequivalente NaOH zu dieser Lösung gegeben, so verschiebt sich das Absorptionsmaximum und befindet sich bei 575 mμ; daraus läßt sich schließen, daß unter dieser Bedingung der gleiche Komplex wie der unter C. gegebenen Bedingung gebildet wird.

d. Infrarotspektren.

Da bei einer Komplexbildung Verschiebung der Absorptionsbanden im Infrarot-Gebiet auftreten sollen, werden Infrarotaufnahmen des Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3 (Abb. 12) mit der des Cu-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3-Komplexes (Abb.13) verglichen.

Das Spektrum von Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3 zeigt eine starke Absorptionsbande bei 3250 cm^{-1} gemäß der NH-Valenzschwingung (18). Die Erscheinung dieser Valenzschwingung bei verhältnismäßig niedrigerer Frequenz als gewöhnlich ist wahrscheinlich durch die Wasserstoffbindungen verursacht. Beim Cu-Peptidkomplex verschiebt sich diese Absorptionsbande nach einer höheren Frequenz und befindet sich dann bei 3330 cm^{-1}. Das könnte so erklärt werden, daß bei einer Komplexbildung die allgemeine Tendenz zur Wasserstoffbrückenbildung reduziert wird.

Beträchtliche Unterschiede liegen im 1700 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1}-Bereich. Beim Cu-Peptid-Komplex ist die Amidbande I (1645 cm^{-1}) und die Amidbande II (1540 cm^{-1}) zugunsten eines gemeinsamen breiteren Absorptionsbereichs vereinigt. Dieses weist auf eine Wechselwirkung zwischen Peptidbindung und Metall-Ion hin, wofür auch die Verschiebung der Amidbande IV (1400 cm^{-1}) spricht.

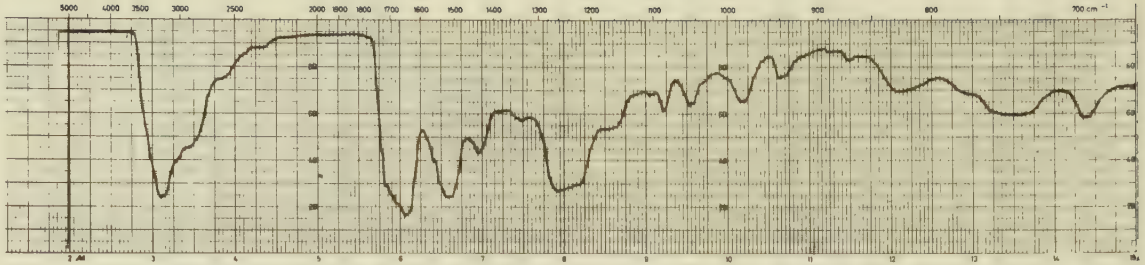


Abb. 12 IR-Absorptionsspektrum von Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3

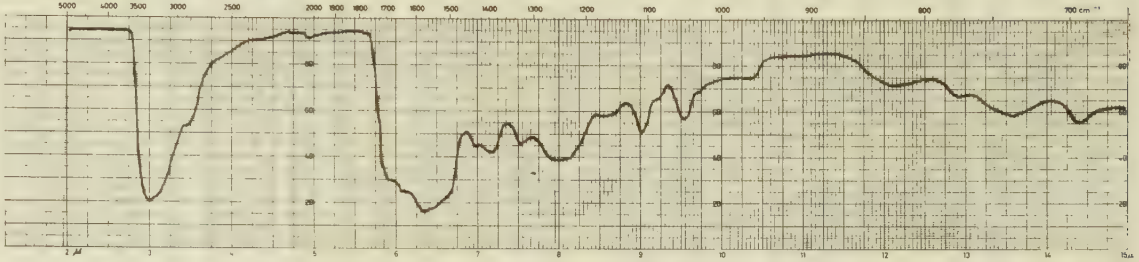


Abb. 13 IR-Absorptionsspektrum von Cu-cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3-Komplex

W. Otting (19) hat beobachtet, daß die Absorptionsbande bei 1045 cm^{-1} gemäß der NH-Deformationsschwingung der Iminogruppe des Imidazolringes bei einer Salzbildung verschwindet; z.B. zeigt das Silbersalz des Imidazols diese Bande nicht. Die Tatsache, daß diese Bande beim Cu-Peptid-Komplex vorhanden ist, zeigt, daß diese Gruppe an der Komplexbildung nicht teilnimmt.

Die Absorptionsbanden bei 1260 cm^{-1} und 1142 cm^{-1}, die in beiden Spektren auftreten, entsprechen der "Ring Breathing" Schwingung des Imidazolringes (20). Beim Cu-Peptid-Komplex ist die Bande bei 935 cm^{-1} gemäß der nicht ebenen Deformationsschwingungen der CH-Gruppierung im Imidazolring verschwunden.

Während sich beim Vergleich des Spektrums des Peptides und seines Kupferkomplexes nur deutliche Unterschiede herangezogen wurden, die eine Komplexbildung wahrscheinlich machen, wird hier jedoch nicht der Versuch gemacht, aus dem IR-Spektrum des Komplexes dessen Struktur zu ermitteln, was lediglich durch systematische Untersuchungen von Serien von IR-Aufnahmen möglich wäre.

Die vorliegenden Spektren wurden mit Hilfe der von L.J. Bellamy (18) und W. Otting (21) angegebenen empirischen Daten untersucht.

e. Diskussion der Ergebnisse.

Die in Tabelle 1 wiedergegebenen relativen Assoziationskonstanten zeigen, daß die Assoziationskonstanten der Cu-Peptid-Komplexe, die zwei Imidazolgruppen enthalten, sich untereinander nur wenig unterscheiden. Würde man annehmen, daß bei diesen Komplexen das Peptidmolekül mit dem Metall-Ion nur über die Pyridinstickstoffe der Imidazolringe verknüpft seien, dann würden die Ringgrößen der Metall-Chelatringe bei den verschiedenen hier in Frage stehenden Komplexe folgendermaßen aussehen :

Beim Cu-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3-Komplex	11-gliedriger Ring
Beim Cu-Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3-Komplex	14-gliedriger Ring
Beim Cu-Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-OC_2H_5-Komplex	17-gliedriger Ring
Beim Cu-Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5-Komplex	14-gliedriger Ring

Derart große Ringe sind bei Metall-Chelaten ungewöhnlich (22) und bei deren Bildung würden sich grosse Unterschiede bei den Komplexbildungskonstanten ergeben. Jedoch zeigen die experimentellen Ergebnisse, daß die vier hier betrachteten Cu-Peptid-Komplexe in fast gleicher Weise stabil sind. Um diese Erscheinung zu interpretieren, wird angenommen, daß die Komplexe durch Einbeziehung der Peptidbindung stabilisiert werden, wobei eine Abdissoziation des Wasser-

stoffatoms stattfindet. Diese Erklarung beruht auf der Tatsache, daß während der Titration der Lösung von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ und eines dieser Peptidhydrochloride (im molaren Verhältnis 1:1) vier Protonen freigesetzt werden. Dabei kommen zwei Protonen von den quarternierten Pyridinstickstoffen der Imidazolringe, während die restlichen zwei Protonen von den Peptidbindungen abdissoziieren. Diese ungewöhnliche Reaktion, bei der die Säureamidgruppe innerhalb der Peptidbindung an der Komplexbildung teilnimmt, ist bereits an ungeschützten Peptiden beobachtet worden; z. B. im Falle des Cu-Glycylglycin-Komplexes (7,23) soll erst die Bindung zwischen Metall und α-Aminogruppe stattfinden und anschließend sich die Peptidbindung an der Komplexbildung beteiligen. Dagegen soll nach F.R.N. Gurd und Mitarbeiter (24) die Imidazolgruppe nicht den gleichen Einfluß auf die Beteiligung der Peptidbindung an der Komplexbildung haben wie die ungeschützte α-Aminogruppe. So fanden sie, daß der Cu-Cbo-L-pro-L-his-gly-NH_2-Komplex sich im Molverhältnis 1:4 ausbildet, wobei vier Peptidmoleküle über die entsprechenden Pyridinstickstoffe der Imidazolringe mit dem Cu^{++} verknüpft sind. Im Gegensatz zu ihrer Auslegung zeigt das Ergebnis dieser Arbeit, daß Cu^{++} mit dem Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 einen Komplex im Molverhältnis 1:2 bildet. (Bei diesem Peptid sind wie bei dem von F.R.N. Gurd und Mitarbeitern benutzten Peptid die α-Aminogruppe und Carboxylgruppe geschützt und nur die mittelständige Aminosäure trägt eine aktive Seitengruppe). Dieses molare Verhältnis ist so zu erklären, daß jedes

Peptidmolekül mit dem Cu^{++} nicht nur über den Pyridinstickstoff des Imidazolringes, sondern auch über die Peptidbindung verknüpft ist. Diese ungewöhnliche Reaktion des Cu^{++} mit der Säureamidgruppe kann durch die Annahme erklärt werden, daß durch die Bindung des Cu^{++} am Pyridinstickstoff des Imidazolringes das Metall-Ion an die anderen Gruppen des Moleküls so angenähert wird, daß auch die schwächeren koordinativen Gruppen mit ihm in Wechselwirkung treten können.

Nach diesem Ergebnis folgt die nächste Frage, ob die Wechselwirkung zwischen Metall-Ion und Peptidbindung am O- oder N-Atom stattfindet. Eine Peptidbindung kann durch die folgenden mesomeren Grenzformeln wiedergegeben werden :

Wahrscheinlich ist Cu^{++} infolge elektrostatischer Kräfte bei niedrigem p_H mit dem O-Atom der Peptidbindung verknüpft (25). Mit steigendem p_H bei der Titration der Lösung von Cu^{++} und Peptid wird ein Proton aus der Peptidbindung entfernt, gleichzeitig kann eine Umlagerung erfolgen, wonach Cu^{++} koordinativ mit dem N-Atom der Peptidbindung verknüpft wird. Dies ist um so wahrscheinlicher, da Cu^{++} eher das N-Atom als das O-Atom als Liganden bevorzugt (26).

III. Experimenteller Teil

a. Präparativer Teil

I. N-Carbobenzoxyglycinhydrazid

Nach B.F. Erlanger und E.J. Brand (28)

Ansatz: 13,9 g (0,1 Mol) Glycinäthylester·HCl
22,2 g (0,13 Mol) Carbobenzoxychlorid
7,5 g (0,15 Mol) Hydrazinhydrat

Ausbeute: 14,8 g (66,38% der Theorie)
Fp. 115° C.
$C_{10} H_{13} O_3 N_3$ MG.: 223,12

II. N-Carbobenzoxyglycyl-L-histidinhydrazid (27)

Man suspendiert 25,2 g (0,1 Mol) L-His-OCH_3·2HCl in 500 ml absolutem, mit Ammoniak gesättigtem Chloroform und rührt die Suspension 30 Minuten. Danach filtriert man vom ausgefallenen Ammoniumchlorid ab und zieht das Lösungsmittel im Vakuum bei 25°C. ab. Der Rückstand wird in 200 ml Chloroform gelöst und die Lösung unter Eis-Kocksalz-Kühlung aufbewahrt.

Man löst 22,3 g (0,1 Mol) Cbo-gly-$N_2 H_3$ in einer Mischung aus 200 ml Wasser, 25 ml konz. Salzsäure und 50 ml Eisessig, kühlt die Lösung auf 0°C. und versetzt sie mit 10 g $NaNO_2$, die in 20 ml Wasser gelöst waren. Das N-Cbo-gly-N_3 fällt sofort als kristalliner Niederschlag aus, der mit

1 Liter Chloroform bei 0°C extrahiert wird. Die Chloroformlösung wird mit vorgekühltem Wasser, $NaHCO_3$-Lösung und nochmals mit Wasser ausgeschüttelt, kurz über Na_2SO_4 getrocknet und mit der obigen Lösung des freien L-His-OCH_3 vereinigt. Nachdem das Reaktionsgemisch 24 Std. im Kühlschrank belassen wurde, wird von eventuell ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert, das Filtrat im Vakuum stark eingeengt und durch wiederholtes Versetzen und Abdestillieren mit Methanol vom Chloroform befreit. Den obigen Rückstand löst man in 200 ml Methanol, gibt 10 ml Hydrazinhydrat hinzu, kocht 1/2 Std. und läßt 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Das auskristallisierte N-Cbo-gly-L-his-$-N_2H_3$ wird abgesaugt und aus Methanol-Wasser (4:1) umkristallisiert.

Ausbeute : 25 g (70% der Theorie)

Fp. 207°C

$C_{16}H_{20}O_4N_6$ MG.: 360,38

Berechnet: N 23,31%

Gefunden: N 23,33%

III. N-Carbobenzoxyglycyl-L-histidylglycinäthylester (27)

Man bereitet wie unter II. beschrieben eine Lösung von 0,1 Mol freiem Glycinäthylester in 100 ml Chloroform, die man wiederum unter Eis-Kochsalz-Kühlung aufbewahrt.

36.04 g (0,1 Mol) N-Cbo-gly-L-his-$-N_2H_3$ werden in einer

Mischung aus 200 ml Wasser und 20 ml konz. Salzsäure gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung gibt man unter Rühren 14 g (0,2 Mol) $NaNO_2$ in 20 ml Wasser und nach 10 Minuten 100 ml 50%-ige K_2CO_3-Lösung, wonach das entstandene N-Cbo-gly-L-his-N_3 ausfällt. Es wird sofort mit 1,5 l gekühltem Essigester extrahiert, zweimal mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Diese Lösung wird in die oben bereitete Lösung des freien Glycinäthylester eingegossen. Das entstandene Tripeptid N-Cbo-gly-L-his-gly-$-OC_2H_5$ beginnt sofort auszukristallisieren. Nach 16-stündigem Stehen im Kühlschrank ist die Kristallisation beendet und das Tripeptid wird abgesaugt, mit wenig Essigester gewaschen und aus Aethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 27 g (62,5% der Theorie)

Fp. 172°C

$[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ ($\pm$ 1) (C = 1 in Aethanol)

$C_{20}H_{25}O_6N_5$ MG.: 431,46

IV. N-Carbobenzoxyglycyl-L-histidylglycin

4,31 g (0,01 Mol) N-Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 werden in 100 ml Äthanol unter gelindem Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen fügt man 11 ml 1n- KOH -Lösung hinzu und läßt 1 1/2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird die Lösung mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 1n-HCl bis p_H 6 angesäuert. Die Lösung wird im Vakuum bis auf 15 ml einge-

engt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Am nächsten Tag wird das N-Cbo-gly-L-his-gly-OH abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen, über P_2O_5/NaOH getrocknet und aus Aethanol umkristallisiert.

Ausbeute : 3,7 g (91,8% der Theorie)

Fp. 178°C (Zersetzung)

$[\alpha]_D^{20}$ = -8,3°(±1) (C = 1, Methanol)

$C_{18}H_{21}O_6N_5$ MG.: 403,46

Berechnet: N 17,37%

Gefunden : N 16,83%

V. Glycyl-L-histidylglycin

4,03 g (0,01 Mol) N-Cbo-gly-L-his-gly-OH werden in 120 ml Eisessig-Wasser (1:1) gelöst und mit 2 g Bariumsulfat-Palladiumoxyhydrat- Katalysator versetzt. Durch diese Mischung wird 2 Stunden Wasserstoff geleitet, wobei die Carbobenzoxygruppe abhydriert wird. Die sich im Reaktionskolben entwickelnden Gase leitet man durch eine Waschflasche mit $Ba(OH)_2$-Lösung. Die Hydrierung ist beendet, wenn das Barytwasser, welches gegen Ende der Reaktion öfters erneuert wird, nicht mehr getrübt ist. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Um den restlichen Eisessig zu entfernen, wird dreimal Aceton hinzugefügt und jedesmal im Vakuum abgezogen. Die zurückbleibende Masse

wird in 40 ml Wasser gelöst und mit Aceton ausgefällt. Das gewonnene Gly-L-his-gly-OH kristallisiert man aus Wasser um.

Ausbeute : 1,84 g (65,2% der Theorie)

Fp. 234°C

$[\alpha]_D^{20}$ = + 2,5°(±1) (C = 1, Eisessig)

$C_{10}H_{15}O_4N_5$ MG.: 269,14

Berechnet: N 26,02%

Gefunden: N 25,72%

VI. N-Carbobenzoxyglycyl-L-histidyl-L-histidinmethylester

0,01 Mol nach II. dargestellter freier L-His-OCH_3 wird wie unter III. beschrieben mit 0,01 Mol aus N-Cbo-gly-L-his-N_2H_3 dargestelltem N-Cbo-gly-L-his-N_3 gekuppelt. Das ausfallende Oel wird nach längerem Stehen im Kühlschrank fest. Man saugt das feste Produkt ab, löst es in Alkohol, fällt mit Aether das entstandene N-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3 aus und kristallisiert es aus Dioxan um.

Ausbeute: 2,34 g (43,9% der Theorie)

Fp. 135°C

$[\alpha]_D^{20}$ = - 11,4°(± 1) (C = 1, Methanol)

$C_{23}H_{27}O_6N_7 \cdot 2H_2O$ MG.: 533,52

Berechnet: N 18,44%

Gefunden: N 18,38%

VII. Carbobenzoxy-L-histidylglycyl-L-histidinmethylester

3,78 g (0,01 Mol) N-Cbo-L-his-gly-N_2H_3 (11) werden in einer Mischung aus 25 ml Wasser und 3 ml konz. Salzsäure gelöst, auf -5°C gekühlt, mit 1,4 g (0,02 Mol) $NaNO_2$, die in 10 ml Wasser gelöst sind, und nach 10 Minuten mit 15 ml gekühlter 50%-iger K_2CO_3-Lösung versetzt. Das dabei ausfallende N-Cbo-L-his-gly-N_3 wird schnell abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Das feste Azid trägt man unter kräftigem Rühren in eine nach II. bereitete Lösung von 0,01 Mol freien L-His-OCH_3 in 200 ml Dimethylformamid ein. Die Mischung läßt man 24 Stdn. im Kühlschrank stehen, zieht danach das Dimethylformamid im Vakuum ab und löst den Rückstand in Aethanol. Durch Zugabe von Aether fällt das entstandene N-Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3 aus, welches aus 70 ml Aethanol umkristallisiert wird.

Ausbeute : 2,9 g (58,4% der Theorie)

Fp. 184°C

$[\alpha]_D^{20}$ = -8,0° (± 1) (C = 1 in Methanol)

$C_{23}H_{27}N_7O_6$ MG.: 497,52

	C	H	N
Berechnet:	55,52%	5,43%	19,72%
Gefunden:	55,14%	5,56%	20,14%

VIII. N-Carbobenzoxy-glycyl-L-histidylglycinhydrazid

4,31 g (0,01 Mol) N-Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 werden in 50 ml

absolutem Alkohol gelöst und mit 0,6 ml $N_2H_4 \cdot H_2O$ versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 1/2 Stdn. unter Rückflußkühlung gekocht und über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend saugt man das ausgefallene N-Cbo-gly--L-his-gly- N_2H_3 ab, wäscht es mit Aether und kristallisiert es dreimal aus Alkohol (90%-ig) um.

Ausbeute : 2,9 g (69,4% der Theorie)

Fp. 199°C

$C_{18}H_{23}O_5N_7$ MG.: 417,44

	C	H	N
Berechnet:	51,80%	5,58%	23,08%
Gefunden:	51,45%	5,12%	23,08%

IX. Glycyl-L-histidylglycinäthylester-2HBr

4,32 g (0,01 Mol) N-Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 werden in 50 ml 1 n HBr/Eisessig gelöst. Nach 1 Std. ist die CO_2-Entwicklung beendet. Das Peptid wird mit trocknem Aether ausgefällt. Nach mehrmaligem Verreiben mit absolutem Aether wird das Oel fest. Es wird abgesaugt und die hygroskopische Masse über P_2O_5/NaOH getrocknet.

Ausbeute: 4,0 g (90% der Theorie)

$C_{12}H_{19}O_4N_5 \cdot 2HBr$ MG.: 459,17

X. N-'Carbobenzoxyglycyl-L-histidylglycylglycyl-L-histidyl-glycinäthylester

0,46 g (0,001 Mol) Gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HBr$ werden ohne weitere Reinigung in 10 ml Alkohol gelöst, die Lösung bis auf 0°C abgekühlt und 0,5 ml Dicyclohexylamin hinzugefügt. Die Mischung wird 15 Minuten lang gerührt und danach abfiltriert. Es wird dann mit 20 ml Dioxan verdünnt und bei 0°C aufbewahrt.

0,418 g (0,001 Mol) N-Cbo-gly-L-his-gly-N_2H_3 löst man in 10 ml Wasser und 0,5 ml konz. Salzsäure, kühlt die Lösung auf 0°C und fügt 0,14 g (0,002 Mol) $NaNO_2$ in 2 ml H_2O hinzu. Nach 10 Minuten werden 3 ml 50%-ige gekühlte K_2CO_3-Lösung hinzugegeben. Das Peptid beginnt nach einer halben Stunde auszukristallisieren. Nach 24 Stunden Stehen im Kühlschrank wird es abgesaugt und mit Aether gewaschen.

Das Peptid ist sowohl in gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln als auch in Wasser oder in wässrigem Alkohol unlöslich. Zur Reinigung wird es in 25 ml 0,1 n HCl gelöst und mit 0,1 n NaOH der p_H 6,4 eingestellt, sofort beginnt das N-Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-OC_2H_5 in schönen Kristallen auszufallen. Es wird zwei Stunden im Kühlschrank belassen, danach abgesaugt, mit Wasser gewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0,352 g (51,01% der Theorie)

Fp. 248°C (Zersetzung)

$[\alpha]_D^{20}$ = -17,6° (± 1) (C = 1 in Eisessig)

$C_{30}H_{38}N_{10}O_9 \cdot H_2O$ MG.: 700,71

	C	H	N
Berechnet:	51,43%	5,75%	19,99%
Gefunden:	51,62%	5,72%	19,99%

XI. N-Carbobenzoxyglycyl-L-histidylglycylglycylglycin-äthylester

4,2 g (0,02 Mol) Gly-gly-$OC_2H_5 \cdot$ HCl werden nach der Vorschrift II. in den freien Peptidester übergeführt, in 50 ml Chloroform gelöst und die Lösung in Eis-Kochsalzmischung aufbewahrt. Zu dieser Lösung wird eine aus 7,2 g (0,02 Mol) Cbo-gly-L-his-N_2H_3 nach Vorschrift III. bereitete Lösung von Cbo-gly-L-his-N_3 in 350 ml Essigester hinzugegeben. Es beginnt sofort das N-Cbo-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5 auszukristallisieren. Nach 24 Stunden Stehen im Kühlschrank wird das Peptid abgesaugt, mit Aether gewaschen und aus 100 ml 90%-igem Aethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 6,5 g (66,6% der Theorie)

Fp. 198°C

$[\alpha]_D^{20}$ = -10,3° (±1) (C = 1 in Eisessig)

$C_{22}H_{28}O_7N_6$ MG.: 488,51

	C	H	N
Berechnet:	54,1%	5,85%	17,21%
Gefunden:	54,48%	6,53%	17,57%

XII. Glycyl-L-histidylglycylglycinäthylester

4,88 g (0,01 Mol) N-Cbo-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5 werden in 80 ml Aethanol, 20 ml Wasser und 10 ml Eisessig gelöst und unter Hinzugabe von 2 g Bariumsulfat-Palladiumoxyhydrat-Katalysator nach der unter V. beschriebenen Methode hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird der Katalysator abzentrifugiert, das Lösungsmittel bei 35°C im Vakuum abgezogen und der Rückstand ohne weitere Reinigung zur Weiterverarbeitung nach XIII. verwendet.

XIII. N-Carbobenzoxyglycyl-L-histidylglycyl-L-histidylglycylglycinäthylester

Aus 3,61 g (0,01 Mol) N-Cbo-gly-L-his-N_2H_3 wird nach der unter III. beschriebenen Vorschrift das Azid dargstellt und in 100 ml Essigester gelöst. Diese Lösung wird zu einer Lösung von 3,54 g (0,01 Mol) Gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5 in 100 ml Methanol bei -5°C hinzugegeben und 24 Stunden im Kühlschrank stehen gelassen. Das N-Cbo-gly-L-his-gly-his-gly-gly-$-OC_2H_5$ kristallisiert in feinen Nadeln aus und wird aus 80%-igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3,4 g (50% der Theorie)

$[\alpha]_D^{20}$ = -10,4° (∓ 1) (C = 1 in Eisessig)

Fp. 233°C (Zersetzung)

$C_{30}H_{38}O_9N_{10}$ MG.: 682,71

	C	H	N
Berechnet:	52,80%	5,57%	20,68%
Gefunden:	52,81%	5,95%	20,36%

b. Potentiometrische Titrationsmessungen

Die Ausführung der potentiometrische Titrationen erfolgt nach der auf Seite 13 angegebene Methode. Die stufenweise Komplexbildung wird durch die fortlaufenden Werte von $\bar{n}$ erkannt, die sich nach der Gleichung $\bar{n} = \frac{[L_o] - \alpha[L]}{[M_o]}$ ergeben.

Die p_H-Messungen der Lösungen werden in den folgenden Tabellen wiedergegeben:

Tabelle 3

Potentiometrische Titration des Gemisches von Cbo-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot HCl$ (0,25 m Mol) und $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,125 m Mol) in 50 ml von 0,1 m NaCl-Lösung mit 0,1 n NaOH

0,1 n NaOH (ml)	p_H	$-\log[L]$	$\bar{n}$	$\log K_1$
0	3,80			
0,25	4,30	4,4968	0,187	3,86
0,50	4,80	4,0479	0,364	3,80
0,75	5,01	3,9059	0,550	3,99
1,00	5,20	3,7729	0,732	4,21+
1,50	5,45			
2,00	5,65			
2,50	5,80			
3,00	6,00			
3,50	6,21			
4,00	6,40			
4,50	6,62			
5,00	6,90			
5,50	9,45			

Mittelwert von $\log K_1 = 3,88$

+ Da dieser Wert von $\log K_1$ am Rand der Assoziationsstufe liegt und danach die nächste Stufe in der Reaktion auftritt, wird er nicht sehr genau sein. Aus diesem Grund wird dieser Wert zur Auswertung des Mittelwertes von $\log K_1$ ausgelassen.

Tabelle 4

Potentiometrische Titration des Gemisches von Cbo-gly-L-his-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ (0,25 m Mol) und $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,25 m Mol) in 50 ml von 0,1 m NaCl-Lösung mit 0,1 n NaOH

0,1 n NaOH (ml)	p_H	$-\log[L]$	$\bar{n}$	$\log K_1$
0	3,50			
0,5	3,90	7,3491	0,094	6,36
1,0	4,10	7,0028	0,192	6,28
1,5	4,23	6,8010	0,292	6,42
2,0	4,40	6,5300	0,390	6,34
2,5	4,57	6,2732	0,487	6,25
3,0	4,70	6,1140	0,586	6,27
3,5	4,85	5,9452	0,686	6,29
4,0	5,05	5,7478	0,792	6,33
4,5	5,21	5,7279	0,890	6,64+
5,0	5,40			
5,5	5,52			
6,0	5,65			
6,5	5,75			
7,0	5,85			
7,5	5,95			
8,0	6,05			
8,5	6,14			
9,0	6,25			
9,5	6,36			
10,0	6,95			
10,5	8,40			

Mittelwert von $\log K_1 = 6,32$

+ Aus dem Grund der auf Seite 50 angegeben ist, wird dieser Wert zur Auswertung des Mittelwertes von $\log K_1$ ausgelassen.

Tabelle 5

Potentiometrische Titration des Gemisches von Cbo-L-his-gly-L-his-$OCH_3 \cdot 2HCl$ (0,25 m Mol) und $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,25 m Mol) in 50 ml von 0,1 m NaCl-Lösung mit 0,1 n NaOH.

0,1 n NaOH (ml)	p_H	$-\log[L]$	$\bar{n}$	$\log K_1$
0	3,60			
0,5	3,80	7,1501	0,094	6,17
1,0	4,20	6,8030	0,186	6,16
1,5	4,35	6,5632	0,294	6,29
2,0	4,50	6,3330	0,388	6,13
2,5	4,65	6,1149	0,486	6,10
3,0	4,80	5,9201	0,586	6,07
3,5	4,92	5,7873	0,682	6,12
4,0	5,10	5,6368	0,784	6,20
4,5	5,30	5,5567	0,887	6,45+
5,0	5,48			
5,5	5,60			
6,0	5,70			
6,5	5,80			
7,0	5,87			
7,5	5,93			
8,0	6,05			
8,5	6,15			
9,0	6,30			
9,5	6,50			
10,0	7,00			
10,5	8,30			

Mittelwert von $\log K_1 = 6,15$

+ Aus dem Grund der auf Seite 50 angegeben ist, wird dieser Wert zur Auswertung des Mittelwertes von $\log K_1$ ausgelassen.

Tabelle 6

Potentiometrische Titration des Gemisches vom Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HCl$ (0,25 m Mol) und $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,25 m Mol) in 50 ml von 0,1 m NaCl-Lösung mit 0,1 n NaOH

0,1 n NaOH (ml)	p_H	$-\log[L]$	$\bar{n}$	$\log K_1$
0	3,60			
0,5	4,00	7,0996	0,096	6,12
1,0	4,30	6,5533	0,190	5,92
1,5	4,45	6,3136	0,288	5,92
2,0	4,60	6,0834	0,384	5,88
2,5	4,75	5,8670	0,480	5,84
3,0	4,90	5,6700	0,580	5,81
3,5	5,04	5,5037	0,680	5,83
4,0	5,30	5,2014	0,776	5,74
4,5	5,50	5,1300	0,882	6,00+
5,0	5,75			
5,5	5,90			
6,0	6,11			
6,5	6,20			
7,0	6,29			
7,5	6,50			
8,0	6,69			
8,5	7,05			
9,0	7,28			
9,5	7,55			
10,0	7,85			
10,5	8,40			

Mittelwert von $\log K_1 = 5,83$

+ Aus dem Grund der auf Seite 50 angegeben ist, wird dieser Wert zur Auswertung des Mittelwertes von $\log K_1$ ausgelassen.

Tabelle 7

Potentiometrische Titration des Gemisches vom Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-$OC_2H_5 \cdot 2HCl$ (0,25 m Mol) und $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,25 m Mol) in 50 ml von 0,1 m NaCl-Lösung mit 0,1 n NaOH

0,1 n NaOH (ml)	p_H	$-\log[L]$	$\bar{n}$	$\log K_1$
0	3,65			
0,5	3,90	7,3173	0,101	6,37
1,0	4,20	6,7688	0,186	6,13
1,5	4,38	6,4670	0,280	6,06
2,0	4,52	6,2616	0,390	6,08
2,5	4,70	5,9854	0,484	5,96
3,0	4,87	5,7487	0,584	5,90
3,5	5,02	5,5813	0,680	5,91
4,0	5,18	5,4494	0,781	6,00
4,5	5,40	5,3224	0,880	6,19+
5,0	5,60			
5,5	5,71			
6,0	5,82			
6,5	5,90			
7,0	6,02			
7,5	6,11			
8,0	6,20			
8,5	6,28			
9,0	6,40			
9,5	6,55			
10,0	7,20			
10,5	8,50			

Mittelwert von $\log K_1 = 6,05$

+ Aus dem Grund der auf Seite 50 angegeben ist, wird dieser Wert zur Auswertung des Mittelwertes von $\log K_1$ ausgelassen.

Tabelle 8

Potentiometrische Titration des Gemisches vom Gly-L-his-gly-OH·HCl (0,25 m Mol) und $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,25 m Mol) in 50 ml von 0,1 m NaCl-Lösung mit 0,1 n NaOH

0,1 n NaOH (ml)	p_H	$-\log[L]$	$\bar{n}$	$\log K_1$
0	3,00			
0,5	3,20	10,4286	0,163	9,71
1,0	3,30	10,2964	0,282	9,87
1,5	3,41	10,1575	0,373	9,92
2,0	3,50	10,0269	0,468	9,97
2,5	3,63	9,8449	0,556	9,94
3,0	3,75	9,6692	0,618	9,88
3,5	3,88	9,5339	0,712	9,92
4,0	3,98	9,4912	0,810	10,09
4,5	4,09	9,5721	0,892	10,49+
5,0	4,15			
5,5	4,25			
6,0	4,34			
6,5	4,45			
7,0	4,60			
7,5	5,40			
8,0	6,30			
8,5	7,20			
9,0	8,20			
9,5	9,30			
10,0	10,30			
10,5	10,94			

Mittelwert von $\log K_1 = 9,91$

+ Aus dem Grund der auf Seite 50 angegeben ist, wird dieser Wert zur Auswertung des Mittelwertes von $\log K_1$ ausgelassen.

IV. Zusammenfassung

Zur Untersuchung des Komplexbildungsvermögens der L-Histidin enthaltenden Peptide wurden 1. Cbo-L-his-gly-L-his-OCH_3, 2. Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3, 3. Gly-L-his-gly-OH, 4. Cbo-gly-L-his-gly-gly-L-his-gly-OC_2H_5 und 5. Cbo-gly-L-his-gly-L-his-gly-gly-OC_2H_5 synthetisiert, die noch nicht in der Literatur bekannt sind. Weiterhin wurde Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 nach einer Vorschrift von Fischer und Whetstone (27) hergestellt. Ihr Komplexbildungsvermögen mit Cu^{++} wurde durch potentiometrische Titrationen und spektrometrische Verfahren gemessen. Hierbei wurde gefunden, daß Cu^{++} mit dem Cbo-gly-L-his-gly-OC_2H_5 einen Komplex im Verhältnis 1:2 bildet, wogegen mit den anderen restlichen Peptiden ein 1:1-Komplex entsteht. Die Assoziationskonstanten haben bei den verschiedenen Komplexen unterschiedliche Werte. Bei den Peptidkomplexen, die zwei Imidazolgruppen an verschiedenen Stellen tragen, zeigen die Werte der Assoziationskonstanten untereinander jedoch keine großen Unterschiede.

Da der Analysenwert des Cu-Cbo-gly-L-his-L-his-OCH_3-Komplexes ebenfalls einen 1:1-Komplex beweist, besteht größte Wahrscheinlichkeit, daß nicht nur die Pyridinstickstoffe der Imidazolringe, sondern auch die Peptidbindungen, die sich in günstiger Stellung zum Metall-Ion befinden, an der Komplexbildung teilnehmen.

V. Literaturuebersicht

1) W.Lautsch u. Mitarb.,
Kolloid Z. 161, 36 (1958)

2) W.Lautsch u. Mitarb.,
Kolloid Z. 167, 144 (1959)

3) W.Lautsch u. Mitarb.,
Kolloid Z. 181, 115 (1962)

4) W.Lautsch u. Mitarb.,
Kolloid Z. 183, 38 (1962)

5) J.Bjerrum,
Metal Amine formation in Aqueous
Solutions, P.Haase & Son, Copenhagen (1941)

6) C.B.Monk,
Trans. Faraday Soc. 47, 297 (1951)

7) H.Dobbie u. W.O.Kermach,
Biochem. J. 59, 246 (1955)

8) I.M.Klotz, I.L.Faller u. J.Urquhart,
J. Phys. & Colloid Chem. 54, 18 (1950)

9) A.R.Manyak, C.B.Murphy u. A.E.Martell,
Arch. Biochem. and Biophys. 59, 373 (1955)

10) J.Engelmann,
Dissertation, Justus-Liebig-
Universität, Gießen (1961)

11) R.W.Holley u. E.Sondheimer,
J. Amer. Chem. Soc. 76, 1326 (1954)

12) Th.Wieland u. H.Determann,
Angew. Chemie 75, 539 (1963)

13) J.T.Edsall, G.Felsenfeld,
D.S.Goodman u. F.R.N.Gurd,
J. Amer. Chem. Soc. 76, 3054 (1954)

14) L.E.Maley u. D.P.Mellor,
Australian J. Sci. Research A2, 579 (1949)

15) A.Albert,
Biochem. J. 50, 690 (1952)

16) A.E.Martell, S.Chaberek, R.Coartney,
S.Westerback u. H.Hyytianen,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 3036 (1957)

17) F.R.N.Gurd u. P.E.Wilcox,
Advances in Protein Chemistry 11, 331 (1956)

18) L.J.Bellamy,
The Infra-red Spectra of Complex
Molecules, Methuen and Co., Ltd.,
London (1962)

19) W. Otting,
Chem. Ber. 89, 2887 (1956)

20) D.Garfinkel u. J.T.Edsall,
J. Amer. Chem. Soc. 80, 3807 (1958)

21) W. Otting,
Spektrale Zuordnungstafel der
Infrarot-Absorptionsbanden,
Springer Verlag, Berlin (1963)

22) J.C.Bailar, Jr.,
Chemistry of the Coordination
Compounds, Reinhold Publishing
Corporation, New York (1956)

23) C.B.Murphy u. A.E.Martell,
J. Biol. Chem. 226, 37 (1957)

24) W.L.Koltum, R.E.Clark, R.N.Dexter,
P.G.Katsoyannis u. F.R.N.Gurd,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 295 (1959)

25) B.R.Rabin,
Trans. Faraday Soc. 52, 1130 (1956)

26) A.E.Martell u. M.Calvin,
Chemistry of the Metal Chelate
Compounds, Prentice-Hall, New York (1953)

27) R.F.Fischer u. R.R.Whetstone,
J. Amer. Chem. Soc. 76, 5076 (1954)

28) B.F.Erlanger u. E.J.Brand,
J. Amer. Chem. Soc. 73, 3508 (1951)

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin ausgeführt.

Meinem verstorbenen Lehrer, Herrn Professor Dr. W. LAUTSCH danke ich für die Überlassung des Themas. Herrn Professor Dr. W. BROSER gilt mein Dank für seine wissenschaftliche Betreuung und Herrn Dr. H. GNICHTEL danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Zu besonderem Dank bin ich der Freien Universität und dem Senat von Berlin verpflichtet, durch deren finanzielle Unterstützung die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit geschaffen wurde.

Lebenslauf

Am 16. April 1935 wurde ich als erster von drei Söhnen des Postbeamten Mangharam Shivdasani und seiner Ehefrau Sati, geb. Gidwani, in Karachi geboren.

Von 1941 bis 1945 besuchte ich die dortige Grundschule, danach die Oberschule. Nach der Teilung Indiens emigrierte unsere Familie 1947 nach Bombay, wo ich 1951 das Abitur ablegte. Danach immatrikulierte ich am Jai Hind College der Universität Bombay, wo ich 1955 das B.Sc.-Examen bestand. Anschließend setzte ich das Studium am K. C. College fort, wo ich 1957 den Grad eines M.Sc. unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. V. Bhagwat erwarb.

In den Jahren 1955 - 1957 war ich wissenschaftlicher Hilfsassistent, danach wissenschaftlicher Assistent am K. C. College, Bombay. 1960 immatrikulierte ich auf Einladung der Außenkommission an der Freien Universität Berlin, wo ich die vorliegende Doktorarbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. W. Lautsch und Herrn Professor Dr. W. Broser anfertigte.